

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Stres oksidatif merupakan suatu kondisi ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dengan antioksidan, dimana kadar radikal bebas lebih tinggi dibandingkan antioksidan¹. Istilah stres oksidatif juga didefinisikan sebagai suatu keadaan dimana terjadi peningkatan level *Reactive Oxygen Species* (ROS). Dalam jumlah normal, ROS berperan pada berbagai proses fisiologi seperti sistem pertahanan, biosintesis, hormon, fertilisasi, dan sinyal seluler².

ROS berperan terhadap pathogenesis berbagai inflamasi dan disfungsi sel beta (β). Hiperglikemik menyebabkan peningkatan ROS dalam mitokondria yang berakibat kerusakan DNA. Menurunnya kadar enzim antioksidan sel menjadikan sel beta rentan terhadap stress oksidatif³.

Diabetes merupakan sindrom kronik yang ditandai oleh peningkatan glukosa darah (hiperglikemia) dan sekresi glukosa dalam urin akibat kekurangan jumlah insulin, efek kerja atau keduanya. Biasanya begitu diabetes sudah terdeteksi, sindrom ini sudah berkembang dan telah terdapat satu atau dua komplikasi. Luasnya komplikasi pada diabetes tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan^{4,5}. Fenomena ini dapat disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia secara in vivo dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas⁶.

Radikal bebas yang ada di dalam tubuh dihasilkan oleh proses metabolisme sel normal. Tanpa disadari, dalam tubuh terbentuk radikal bebas secara terus menerus baik melalui proses metabolisme sel normal maupun faktor luar. Kedua faktor tersebut secara sinergis meningkatkan jumlah radikal bebas dalam tubuh^{7,8}. Radikal bebas dalam jumlah yang berlebih akan mengoksidasi dan menyerang komponen lipid membran sel sehingga terjadi peroksidasi lipid. Seiring dengan meningkatnya radikal bebas, maka peroksidasi lipid membran sel juga meningkat yang

menghasilkan produk akhir Malondialdehida (MDA). Untuk meredam kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas diperlukan antioksidan^{9,10}.

Dalam penelitian ini, akan dilakukan pengukuran tingkat oksidatif stress yang terjadi pada mencit yang diinduksi dengan aloksan yang mengakibatkan mencit mengalami penyakit diabetes , yang akan diobati menggunakan mikroalga *Chlorella vulgaris*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dapat dirumuskan suatu permasalahan yaitu :

- 1 Bagaimanakah dampak pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap stress oksidatif pada mencit yang diinduksi aloksan?
- 2 Bagaimanakah pengaruh pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap fungsi pankreas pada mencit menderita diabetes ?

1.3 Tujuan Penelitian

Dari perumusan masalah, maka penelitian ini bertujuan untuk :

- 1 Mengetahui dampak pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap stress oksidatif pada mencit yang diinduksi aloksan.
- 2 Melihat pengaruh pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap fungsi pankreas pada mencit menderita diabetes.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian dapat memberikan informasi bahwa mikroalga *Chlorella vulgaris* dapat memperbaiki stress oksidatif untuk menyembuhkan diabetes pada mencit yang dapat dikonversikan kepada manusia.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga merupakan organisme tumbuhan paling primitif berukuran seluler yang umumnya dikenal dengan nama fitoplankton. Mikroalga hidup pada daerah–daerah perairan ataupun daerah yang berkelembaban tinggi di seluruh dunia. Organisme ini merupakan produsen primer perairan yang mempunyai kemampuan fotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi¹¹.

Chlorella merupakan mikroalga yang termasuk ke dalam kelas alga hijau. Mikroalga ini belum memiliki akar, batang dan daun sejati, tetapi telah memiliki pigmen klorofil sehingga bersifat fotoautotrof. Tubuhnya terdiri atas satu sel (uni selular) dan ada juga yang bersel banyak (multiseluler) dengan sifat yang cenderung membentuk koloni¹¹.

Mikroalga mempunyai zat warna hijau daun (pigmen) klorofil yang berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H₂O, CO₂ dan sinar matahari untuk menghasilkan energi. Energi ini digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan pertambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi. Disamping itu famili *Chlorophyceae* menghasilkan asam lemak tak jenuh omega-3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral. Kandungan beta karoten 900 kali lebih banyak dibandingkan dengan wortel. Sedangkan kandungan omega-3 mikroalga lebih banyak dibandingkan minyak ikan, biji rami, dan kedelai, yaitu 50-60 persen¹². *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenolik, saponin, steroid dan triterpenoid yang bisa menurunkan kadar gula darah bagi penderita diabetes¹³. Flavonoid berperan penting dalam aktivitas antidiabetes yaitu menurunkan kadar glukosa darah secara signifikan¹⁴.

2.2 Morfologi Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris adalah mikroalga yang termasuk ke dalam golongan alga hijau (chlorophyta). Bentuk sel *Chlorella vulgaris* bulat, bulat lonjong dengan garis tengah sel antara 2-8 µm seperti yang ditunjukkan oleh

Gambar 2.1. *Chlorella vulgaris* berkembangbiak dengan cara membelah diri dan pembentukan spora. *Chlorella vulgaris* bersifat fotoautotrof, yaitu dapat membentuk makanannya sendiri melalui proses fotosintesis. Mikroalga *Chlorella vulgaris* adalah jenis tumbuhan yang belum mempunyai akar, batang dan daun sebenarnya, tetapi sudah memiliki klorofil sehingga bersifat autotrof. Tubuhnya terdiri atas satu sel (uniseluler) dan ada pula yang banyak sel (multiseluler). Uniseluler umumnya sebagai fitoplankton sedang yang multiseluler dapat hidup sebagai nekton, bentos atau perifiton. Habitat mikroalga adalah air atau tempat basah, sebagai epifit, atau sebagai endofit. mikroalga berkembangbiak dengan cara vegetatif dan generatif¹⁵.



Gambar 2.1 Bentuk sel mikroalga *Chlorella vulgaris*
(Sumber : Hadiyanto, 2012)

2.3 Klasifikasi *Chlorella vulgaris*

Klasifikasi mikroalga *Chlorella vulgaris* sebagai berikut

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Chlorococcales
Familia	: Oocystaceae
Genus	: Chlorella
Spesies	: <i>Chlorella vulgaris</i> ¹⁶

2.4 Radikal Bebas dan *Reactive Oxygen Species* (ROS)

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri. Kebanyakan radikal bebas bereaksi secara cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan, sehingga radikal bebas normalnya berdiri sendiri hanya dalam periode waktu yang singkat sebelum menyatu dengan atom lain. Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom ($R\cdot$). ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* ($O_2^{\cdot-}$), *hydroxyl radicals* ($OH\cdot$), dan *peroxyl radicals* ($RO_2\cdot$). Yang nonradikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2), dan *organic peroxides* ($ROOH$)¹⁷. Senyawa oksigen reaktif ini dihasilkan dalam proses metabolisme oksidatif dalam tubuh misalnya pada proses oksidasi makanan menjadi energi. ROS yang paling penting secara biologis dan paling banyak berpengaruh pada sistem reproduksi antara lain *superoxide anion* ($O_2^{\cdot-}$), *hydroxyl radicals* ($OH\cdot$), *peroxyl radicals* ($RO_2\cdot$) dan *hydrogen peroxide* (H_2O_2). Bentuk radikal bebas yang lain adalah *hydroperoxyl* ($HO_2\cdot$), *alkoxyl* ($RO\cdot$), *carbonate* ($CO_3^{\cdot-}$), *carbon dioxide* ($CO_2^{\cdot-}$), *atomic chlorine* ($Cl\cdot$), dan *nitrogen dioxide* ($NO_2\cdot$)¹⁸.

2.5 Malondialdehid (MDA)

Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu senyawa produk dari reaksi peroksidasi lipid yang digunakan sebagai marker (petanda) terjadinya stress oksidatif. Pada keadaan stress oksidatif yang tinggi, terjadi peningkatan kadar MDA serum secara signifikan. Bila keadaan stress oksidatif teratasi, kadar MDA kembali menurun¹⁹. Senyawa MDA dapat ditemukan pada jaringan dan darah. Penggunaan kadar MDA untuk menilai stres oksidatif disebabkan karena pembentukan MDA yang akan terus meningkat sesuai dengan kondisi stres oksidatif yang terjadi dan tersedianya pengukuran kadar MDA yang mudah dilakukan

serta memberikan hasil yang akurat. Peroksidasi lipid dari hasil radikal bebas dapat dicegah dengan menggunakan senyawa antioksidan²⁰.

2.6 Sistem Pertahanan Antioksidan dan Stres Oksidatif

Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif yang diproduksi dalam jumlah yang normal, penting untuk fungsi biologis, seperti sel darah putih yang menghasilkan H_2O_2 untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan jamur serta pengaturan pertumbuhan sel, namun ia tidak menyerang sasaran spesifik, sehingga ia juga akan menyerang asam lemak tidak jenuh ganda dari membran sel, organel sel, atau DNA, sehingga dapat menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel²¹. Namun tubuh diperlengkapi oleh seperangkat sistem pertahanan untuk menangkal serangan radikal bebas atau oksidan sehingga dapat membatasi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas. Sistem pertahanan antioksidan ini antara lain adalah enzim *Superoxide Dismutase* (SOD) yang terdapat di mitokondria dan sitosol, *Glutathione Peroxidase* (GPX), *Glutathione reductase*, dan *catalase*. Selain itu terdapat juga sistem pertahanan atau antioksidan yang berupa mikronutrien yaitu β -karoten, vitamin C dan vitamin E^{22,23,24}. Sistem pertahanan ini bekerja dengan beberapa cara antara lain berinteraksi langsung dengan radikal bebas, oksidan, atau oksigen tunggal, mencegah pembentukan senyawa oksigen reaktif, atau mengubah senyawa reaktif menjadi kurang reaktif²¹. Namun dalam keadaan tertentu, produksi radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif melebihi sistem pertahanan tubuh, kondisi yang disebut sebagai stres oksidatif²⁵.

Pada kondisi stres oksidatif, imbalan normal antara produksi radikal bebas atau senyawa oksigen reaktif dengan kemampuan antioksidan alami tubuh untuk mengeliminasi mengalami gangguan sehingga menggoyahkan rantai reduksi-oksidasi normal, sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif jaringan. Kerusakan jaringan ini juga tergantung pada beberapa faktor, antara lain: target molekuler, tingkat stres yang terjadi, mekanisme yang terlibat, serta waktu dan sifat alami dari sistem yang diserang²¹.

2.7 Antioksidan

Antioksidan adalah molekul yang dapat mereduksi efek radikal bebas dengan menstabilkan molekul berbahaya, menetralkan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonasikan elektron untuk mengeliminasi molekul yang dalam kondisi tidak berpasangan²⁶. Penggunaan antioksidan yang bekerja sebagai *scavenger* radikal bebas merupakan suatu strategi untuk mencegah proses inisiasi sel kanker oleh ROS sebagai tahap permulaan karsinogenesis dan demikian dapat menurunkan insiden terjadinya kanker²⁷. Antioksidan menyebabkan resistensi terhadap stres oksidatif dengan meredam radikal bebas, menghambat peroksidasi lipid, dan mekanisme lain sehingga dapat mencegah penyakit²⁸.

Antioksidan terbagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen meliputi superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathion peroksidase/reduktase (GPx/GRx), dan antioksidan eksogen antara lain asam askorbat (Vitamin C), α -tokoferol (Vitamin E), glutathion, karotenoid, dan flavonoid. Tubuh memerlukan asupan antioksidan eksogen dalam jumlah yang memadai agar mampu menginduksi kerja sistem antioksidan seluler sehingga dapat menekan kerusakan sel yang berlebihan dan mempertahankan status antioksidan seluler^{29,30}.

Klasifikasikan antioksidan berdasarkan dua parameter, yaitu:

- a. Berdasarkan kelarutan.
 - i. Antioksidan hidrofilik : mudah larut dalam air dan dapat beraksi dengan oksidan dalam sitoplasma sel dan plasma darah.
 - ii. Antioksidan hidrofobik : larut dalam lemak dan dapat melindungi membran sel dari peroksidasi lipid.
- b. Berdasarkan sifat kerja:
 - i. Antioksidan preventif : berupa enzim seperti SOD (superoksida dismutase), CAT (katalase), GPX (glutathion peroksidase), glutathion reduktase dan beberapa mineral seperti Se, Mn, dan Cu, dan sebagainya. SOD terutama berperan sebagai peredam superoksida

(O₂), katalase berperan sebagai katalis dekomposisi H₂O₂ menjadi air dan oksigen sedangkan GPX mengkatalisis reduksi H₂O₂ dan lipidperoksida selama peroksidasi lipida menjadi air dengan menggunakan glutathion sebagai substrat.

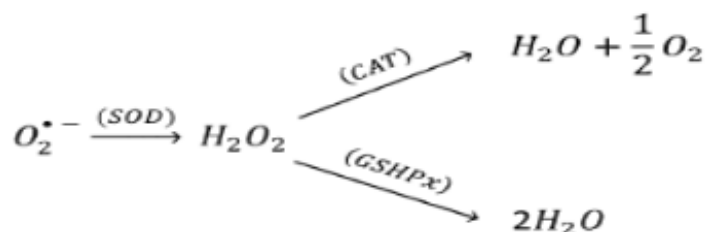
- ii. Antioksidan peredam radikal : meliputi glutathion, vitamin C, asam urat, albumin, bilirubin, vitamin E, karotenoid, dan flavonoid. β -karoten adalah penangkal oksigen tunggal yang sangat baik. Vitamin C berinteraksi secara langsung dengan radikal seperti O₂, OH. GSH adalah penangkal yang baik terhadap banyak radikal seperti O₂, OH, dan berbagai lipid hidroperoksida, dan membantu mendetoksifikasi banyak polusi udara teroksidasi yang terhirup seperti ozon.
- iii. perbaikan dan enzim *de novo*; merupakan gugus kompleks enzim yang berperan memperbaiki kerusakan DNA, protein, lipid teroksidasi dan peroksida, serta menghentikan propagasi rantai radikal lipid peroksil. Enzim-enzim ini dapat memperbaiki kerusakan biomolekul dan merekonstitusi membran sel yang rusak³¹.

2.8 Peran Antioksidan dalam Menangkal Radikal Bebas

Dua jenis antioksidan enzimatis dan non enzimatis berkorelasi memodulasi reaksi radikal bebas. Tubuh melindungi diri dari ROS dengan menggunakan enzim antioksidan untuk mengurangi tingkat hiperperoksida lipid dan H₂O₂, sehingga mencegah peroksidasi lipid dan menjaga struktur dan fungsi membran sel. Contoh antioksidan enzimatis adalah CAT, GSHPx, SOD, dan Peroxiredoxin I-IV. SOD yang terletak di sitosol dan mitokondria mengkonversi O₂^{•-} menjadi oksigen dan H₂O₂ dengan kofaktor ion logam seperti tembaga (Cu), seng (Zn), atau mangan (Mn). Enzim CAT di dalam peroksisom akan mengkonversi H₂O₂ menjadi air dan oksigen. GSHPx ditemukan dalam sitoplasma dan ekstraseluler pada hampir setiap jaringan manusia. GSHPx mengkonversi H₂O₂ menjadi air. Enzim GSHPx memiliki aktivitas kuat terhadap H₂O₂ dan lemak³².

Enzim peroxiredoxin mengkatalisis reduksi H₂O₂, hidroperoksida organik dan peroxinitrit (ONOO). Dengan uraian tersebut, enzim antioksidan berperan mencegah kerusakan oksidatif. Efek sinergis enzim

antioksidan dalam scavenging dari $O_2^{\bullet-}$ dapat dilihat pada Gambar 2.2 efek sinergis CAT, GSHPx, dan SOD dalam Pemerangkapan $O_2^{\bullet-}$.



Gambar 2.2 Efek sinergis CAT, GSHPx, dan SOD dalam pemerangkapan $O_2^{\bullet-}$ (Nimse dan Pal, 2015).

Mekanisme aksi antioksidan melalui beberapa cara yaitu: menekan pembentukan spesies oksigen reaktif dengan menghambat enzim atau elemen yang terlibat dalam produksi radikal bebas; dan *scavenging* reaktif oksigen spesies^{32,33}.

2.9 Diabetes Melitus

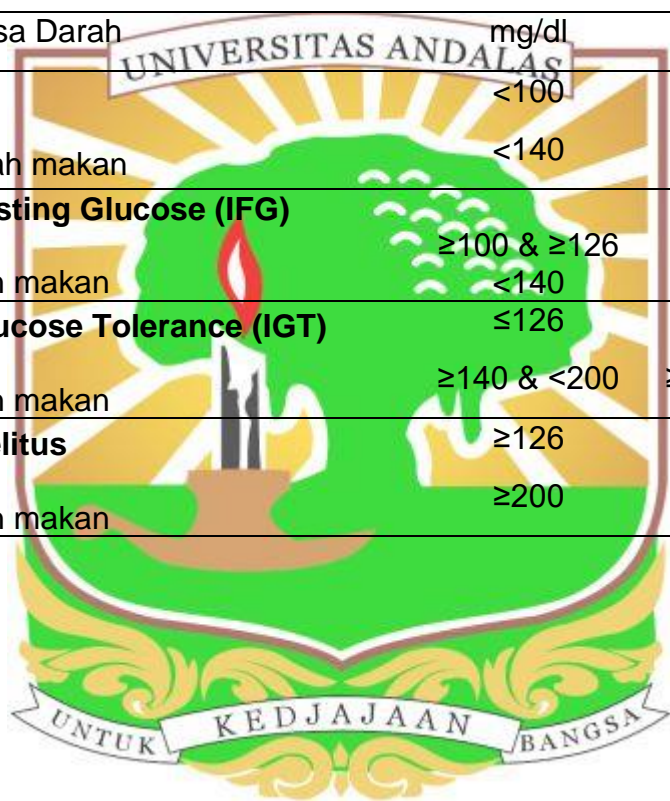
Diabetes melitus adalah penyakit yang di tandai dengan terjadinya hiperglikemia dan gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang dihubungkan dengan kekurangan secara absolut atau relatif dari kerja atau sekresi insulin³⁴. Gejala yang dikeluhkan pada penderita diabetes melitus yaitu polidipsia (rasa haus meningkat), poliuria (sering buang air kecil), polifagia (selera makan yang berlebihan), penurunan berat badan, kesemutan. Diabetes melitus disebut dengan silent killer karena penyakit ini dapat mengenai semua organ tubuh dan menimbulkan berbagai macam keluhan. Diabetes Melitus biasa disebut dengan *the silent killer* karena penyakit ini dapat mengenai semua organ tubuh dan menimbulkan berbagai macam keluhan. Pada umumnya, penyakit yang akan ditimbulkan berupa gangguan serius yang termasuk dalam kasus gawat darurat yaitu, tekanan darah tinggi, penyakit jantung, kerusakan ginjal, katarak, infeksi kulit berat, penyakit pembuluh darah otak³⁵.

Penyakit Diabetes Millitus (DM) yang juga di kenal sebagai penyakit kencing manis / penyakit gula darah adalah golongan penyakit kronis yang

ditandai dengan peningkatan kadar gula dalam darah sebagai akibat adanya gangguan sistem metabolisme dalam tubuh, dimana organ pankreas tidak mampu memproduksi hormon insulin sesuai kebutuhan tubuh³⁶.

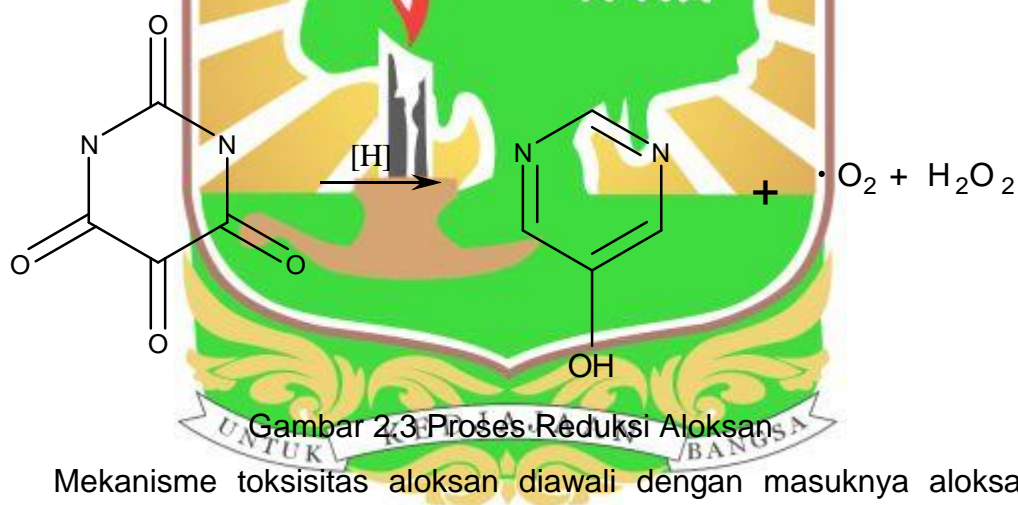
Pada penderita diabetes melitus yang tidak terkontrol, akan terjadi peningkatan kadar glukosa (gula) darah. Oleh karena itu, sangatlah penting untuk mengontrol kadar glukosa dalam darah pasien diabetes melitus. Batas normal dari kadar gula dalam darah dapat dilihat dalam Tabel 2.1 Kadar gula darah

Kadar Glukosa Darah	mg/dl	mmol/dl
Normal		
Puasa	<100	<5,6
2 jam sesudah makan	<140	<7,8
Impaired Fasting Glucose (IFG)		
Puasa	≥100 & <126	≥5,6 & <7,0
2 jam setelah makan	<140	<7,8
Impaired Glucose Tolerance (IGT)	≤126	≤7,0
Puasa	≥140 & <200	≥7,8 & <11,1
2 jam setelah makan		
Diabetes Melitus	≥126	≥7,0
Puasa	≥200	≥11,1
2 jam setelah makan		



2.10 Aloksan

Diabetes melitus dapat disebabkan oleh banyak faktor. Faktor tersebut diantaranya faktor genetik, infeksi oleh kuman, faktor nutrisi, zat diabetogenik, dan radikal bebas (stres oksidatif)³⁷. Aloksan bersifat diabetogenik, secara toksik merusak sel β dari pulau langerhans pada pankreas yang mensekresi hormon insulin. Mekanisme kerja aloksan terhadap insulin adalah aloksan bekerja merusak sel β pankreas melalui pembentukan oksigen reaktif. Pembentukan oksigen reaktif diawali dengan proses reduksi aloksan. Reduksi aloksan menghasilkan asam dialurat disertai adanya oksigen radikal yang kemudian berubah menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2) yang dapat dilihat pada Gambar 2.3. Target dari oksigen reaktif tersebut adalah DNA dari sel β langerhans dan kerusakan DNA tersebut menstimulasi rusaknya seluruh komponen sel β langerhans pada pankreas³⁸.



Mekanisme toksisitas aloksan diawali dengan masuknya aloksan kedalam sel-sel beta pankreas dan kecepatan pengambilan akan menentukan sifat diabetogenik aloksan. Kerusakan sel-sel β terjadi melalui proses secara bersamaan yaitu melalui oksidasi gugus sulfidril dan pembentukan radikal bebas. Mekanisme kerja aloksan menghasilkan kerusakan pada sel β pankreas terutama menyerang senyawa-senyawa seluler yang mengandung gugus sulfidril, asam-asam amino sistein dan protein yang berikatan dengan gugus SH (termasuk enzim yang mengandung gugus SH). Aloksan bereaksi dengan gugus SH yang berikatan pada bagian sisi dari protein atau asam amino membentuk

ikatan disulfida sehingga menginaktifkan protein yang berakibat pada gangguan fungsi protein tersebut³⁹.

2.11 Glibenclamide

Glibenclamide merupakan Obat Hipoglikemik Oral (OHO) golongan sulfonilurea yang hanya digunakan untuk mengobati individu dengan DM tipe II⁴⁰. Dalam beberapa tahun terakhir, glibenclamid telah terbukti menjadi neuroprotektif dalam beberapa penyakit⁴¹. Obat golongan ini menstimulasi sel beta pankreas untuk melepaskan insulin yang tersimpan. Mekanisme kerja obat golongan sulfonilurea dengan cara menstimulasi pelepasan insulin yang tersimpan (stored insulin) dan meningkatkan sekresi insulin akibat rangsangan glukosa. Efek samping OHO golongan sulfonilurea umumnya ringan dan frekuensinya rendah, antara lain gangguan saluran cerna dan gangguan susunan saraf pusat. Golongan sulfonilurea cenderung meningkatkan berat badan. Bila pemberian dihentikan, obat akan bersih dari serum sesudah 36 jam⁴².



BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan November 2017 hingga bulan April 2018. Penumbuhan mikroalga *Chlorella vulgaris* ditumbuhkan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. Proses penelitian terhadap hewan percobaan dilakukan di Laboratorium Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Proses pemeriksaan aktivitas enzim Katalase (CAT) dan Malondialdehid (MDA) dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Proses pemeriksaan uji histopatologi organ pankreas dilakukan di Laboratorium Patologi dan Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Padang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Peralatan penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas, sentrifus, *autoclave*, neraca analitik, spektrofotometer, oven, kandang untuk pemeliharaan mencit, spuit ukuran 3 ml, tempat air minum, alat bedah (skapel, pinset, gunting, jarum), kertas label, *photomicroscop*, alat tes gula darah (glukometer), *tube*.

3.2.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mikroalga *Chlorella vulgaris* yang telah dibiakkan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia Universitas Andalas, medium BBM, etanol, akuades, aloksan, glibenclamide, CMC 1%.

3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Persiapan sampel

Bahan yang diujikan pada mencit adalah biomassa mikroalga *Chlorella vulgaris* dimana mikroalga *Chlorella vulgaris* ini ditumbuhkan dengan menggunakan medium BBM (*Bold Basa Medium*) sebelum didapatkan biomasnya.

3.3.2. Pembuatan medium mikroalga *Chlorella vulgaris*

Medium pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Bold Basa Medium* (BBM) dengan sumber nitrogen NaNO_3 . Medium BBM dengan sumber nitrogen NaNO_3 mengandung 10ml/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 ml/L, NaCl 10ml/L, K_2HPO_4 10ml/L, KH_2PO_4 10ml/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10ml/L, H_3BO_3 1ml/L, trace element 1ml/L, EDTA 1ml/L, Fe-solution 1ml/L. Medium BBM diautoclave selama 1 jam dan didinginkan hingga suhu kamar.

3.3.3 Pembuatan larutan aloksan ($\text{C}_4\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_4$)

Larutan aloksan dibuat dengan dosis 175 mg/kg. Pembuatan larutan aloksan dibuat dengan menimbang aloksan sebanyak 300 mg, kemudian dilarutkan dalam 17 ml akuades.

3.3.4 Pembuatan larutan glibenclamid

Larutan pembanding dibuat dengan dosis manusia 5 mg/kg yang dikonversikan menjadi dosis mencit yaitu 0,013 mg/20g BB. Pembuatan larutan pembanding dengan cara menghaluskan 1 tablet glibenclamide dengan lumpang kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades.

3.3.5 Pembuatan larutan *Chlorella vulgaris*

a) *Chlorella vulgaris* dosis 5 mg/20 g BB mencit

Biomassa *Chlorella vulgaris* ditimbang sebanyak 250 mg kemudian dihaluskan di dalam lumpang selanjutnya ditambahkan dengan 10 ml aquades. Kemudian dipindahkan ke dalam botol film. Selanjutnya campuran didiamkan dalam suhu kamar dan disimpan di dalam lemari pendingin.

b) *Chlorella vulgaris* dosis 10 mg/20 g BB mencit

Biomassa *Chlorella vulgaris* ditimbang sebanyak 500 mg kemudian dihaluskan di dalam lumpang selanjutnya ditambahkan dengan 20 ml aquades. Kemudian pindahkan ke dalam botol film. Selanjutnya campuran didiamkan dalam suhu kamar dan disimpan di dalam lemari pendingin.

3.3.6 Percobaan pemberian aloksan pada mencit

Hewan uji yang telah diaklimatisasi selama 7 hari kemudian dibagi ke dalam 2 kelompok sebagai berikut :

- a) Kelompok normal (Kontrol negatif) : 3 ekor mencit tidak diberi perlakuan apapun, hanya diberi makan pelet dan diberi minum air. Setelah 7 hari, mencit kemudian ditimbang berat badannya dan dilakukan uji kadar glukosa darah mencit.
- b) Kelompok aloksan : 12 ekor mencit disuntikan aloksan dosis 175 mg/kg satu kali, serta diberi makan pelet dan minum air biasa. Setelah 7 hari, mencit kemudian ditimbang berat badannya dan dilakukan uji kadar glukosa darah terhadap mencit yang diberi aloksan.

3.3.7 Percobaan biomassa *Chlorella vulgaris* untuk menurunkan kadar glukosa darah pada mencit

Setelah kelompok Normal dan kelompok aloksan ditimbang berat badan dan diuji kadar glukosa darahnya, kemudian Kelompok normal diteruskan menjadi kelompok kontrol negatif dan Kelompok yang diberi aloksan kemudian dibagi kembali menjadi 4 kelompok (Kelompok P1, P2, pembanding dan kontrol positif) sebagai berikut :

- a) Kelompok normal : 3 ekor mencit diberi makan pelet dan diberi minum air.
- b) Kelompok diabetes : 3 ekor mencit disuntik aloksan dan diberi makan pelet dan minum air.
- c) Kelompok glibenclamid : 3 ekor mencit disuntik aloksan dan diberi makan dengan pelet, air dan obat glibenclamid dengan dosis sebanyak 0,013 mg/20g BB mencit.
- d) Kelompok P1 (250 mg/Kg) : 3 ekor mencit disuntik aloksan dan diberi makan dengan pelet, air, dan *Chlorella vulgaris* (dosis 5 mg/20 g BB mencit).

- e) Kelompok P2 (500 mg/Kg) : 3 ekor mencit disuntik aloksan dan diberi makan dengan pelet, air, dan *Chlorella vulgaris* (dosis 10 mg/20 g BB mencit).

Setelah pemberian perlakuan selama 28 hari berturut-turut, mencit kemudian ditimbang kembali berat badannya dan diambil darahnya untuk uji kadar glukosa darah. Pada hari ke 14 dan ke 28 serum darah mencit diambil untuk diujikan enzim Katalase dan Malondialdehid.

3.3.8 Pengambilan darah dan serum hewan uji

Hewan uji yang telah diberi perlakuan kemudian dilakukan pengambilan darah mencit dengan cara memotong ujung ekor mencit. Mencit dipersiapkan dengan cara dipegang lehernya. Bagian ujung ekor dari mencit kemudian dipotong menggunakan gunting yang sudah disterilkan sampai darah keluar, darah tetesan pertama dibuang dan darah selanjutnya ditetaskan pada test strips. Kemudian masukkan test strip ke alat pengukur (glukometer) selanjutnya akan terukur kadar glukosa darah dari mencit, untuk pengambilan serum darah mencit dengan cara dipegang lehernya lalu bagian vena leher disayat menggunakan silet, darah yang keluar ditampung menggunakan tube, setelah terkumpul darah di sentrifus selama 30 menit untuk memisahkan antara serum dan eritrositnya. Setelah disentrifus dipisahkan antara serum dan eritrosit darah.

3.3.9 Malondialdehid (MDA)

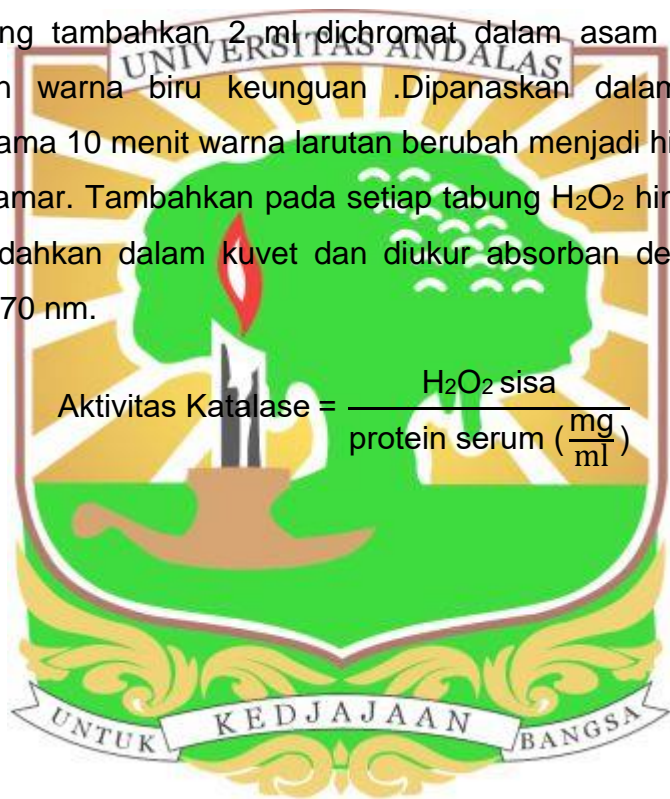
Serum darah direaksikan dengan TCA 5% lalu dicampur dengan menggunakan *vortex mixer* dan disentrifus pada kecepatan 10.000 RPM selama 15 menit. Filtrat dipipet (masing-masing tabung) sebanyak 1ml, ditambahkan reagen asam tiobarbiturat sebanyak 1 ml dan diinkubasi dalam *water bath* selama 30 menit pada suhu 100°C lalu didinginkan. Ukur absorban dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm dan dipisahkan filtratnya.

$$\text{Kadar MDA Sampel} = \frac{\text{Absorban Sampel}}{\text{Absorban Standar}} \times \text{C. Standar}$$

3.3.10 Aktivitas enzim katalase

Sebelum mengukur kadar aktivitas katalase, diukur terlebih dahulu total protein dengan menggunakan alat Mikrolab 300 memakai standar kit, blanko akuades. Serum ditambahkan dengan pewarna total protein lalu diukur adsorban. Enam buah tabung diisi dengan H_2O_2 dalam jumlah yang berbeda yaitu dari konsentrasi 0 μmol sampai 160 μmol . Pada masing-masing tabung tambahkan 2 ml dichromat dalam asam asetat glasial menghasilkan warna biru keunguan. Dipanaskan dalam *water bath* mendidih selama 10 menit warna larutan berubah menjadi hijau, dinginkan pada suhu kamar. Tambahkan pada setiap tabung H_2O_2 hingga volume 3 ml lalu dipindahkan dalam kuvet dan diukur absorban dengan panjang gelombang 570 nm.

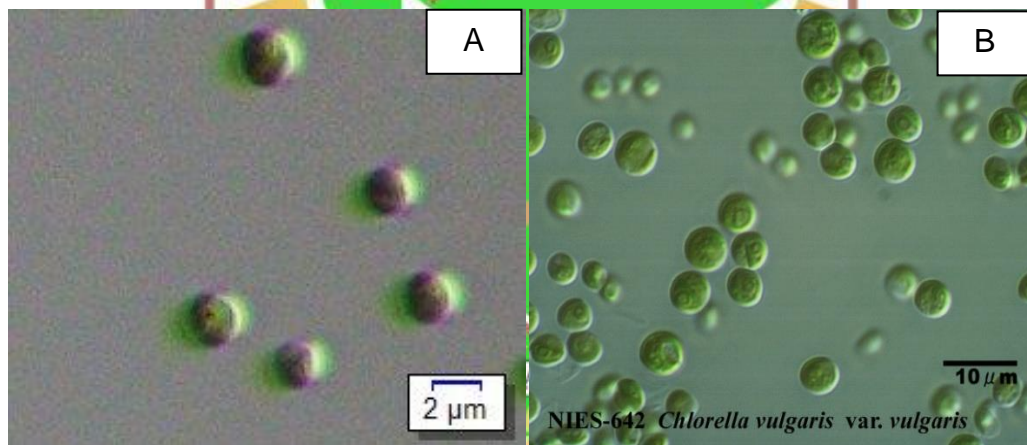
$$\text{Aktivitas Katalase} = \frac{\text{H}_2\text{O}_2 \text{ sisa}}{\text{protein serum} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)}$$



BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Morfologi *Chlorella vulgaris*

Dari identifikasi morfologi yang telah dilakukan pada mikroalga *Chlorella vulgaris* dilihat bahwa *Chlorella vulgaris* merupakan kultur tunggal (Gambar 4.1 A). Identifikasi morfologi ini dilakukan bertujuan untuk melihat apakah mikroalga *Chlorella vulgaris* tersebut mengalami kontaminasi atau tidak, karna jika mikroalga *Chlorella vulgaris* tersebut mengalami kontaminasi maka mikroalga tersebut tidak dapat digunakan untuk penelitian, karna hal ini akan menyebabkan data yang dihasilkan tidak maksimal. Identifikasi mikroalga *Chlorella vulgaris* ini dilakukan sebelum mikroalga ditumbuhkan dan dipanen seperti yang terlihat pada Gambar 4.1 A. Berdasarkan Gambar 4.1 A bisa dilihat bahwa morfologi *Chlorella vulgaris* sama dengan morfologi dari literature seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.1 B.



Gambar 4.1 . (A) Morfologi *Chlorella vulgaris* pembesaran 1000x (B) morfologi *Chlorella vulgaris* dari Hadiyanto

4.2 Biomassa Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Pada saat mikroalga *Chlorella vulgaris* mengalami fase stasioner (tetap) yang ditandai dengan pekatnya warna larutan mikroalga yang ditumbuhkan yaitu berwarna hijau pekat sementara warna hijau yang terbentuk berasal dari warna pigmen hijau (klorofil) yang disintesis oleh mikroalga. hal ini menunjukkan bahwa mikroalga tersebut siap untuk

dipanen, pada fasa stasioner inilah terjadinya proses pembentukan metabolit sekunder.



Gambar 4.2 Kondisi mikroalga yang dipanen

Mikroalga *Chlorella vulgaris* diendapkan semalam untuk memisahkan antara filtrate dan endapan, setelah endapan mengendap semua maka dipisahkan endapan dari filtrat dan diletakkan di cawan lalu mikroalga tersebut dikeringanginkan selama 2-3 hari. Untuk setiap 1000ml kultur cair mikroalga didapatkan biomassa kering $\pm 0,52$ total biomassa kering *Chlorella vulgaris* yang didapatkan selama 16 masa kultivasi yaitu 8,32 gram dengan warna biomassa kering *Chlorella vulgaris* yaitu hijau tua. Selanjutnya biomassa kering akan diinduksikan ke mencit dengan variasi 2 dosis yaitu dosis 250mg/Kg (5mg/20gBB) dan 500mg/Kg (10mg/20gBB).

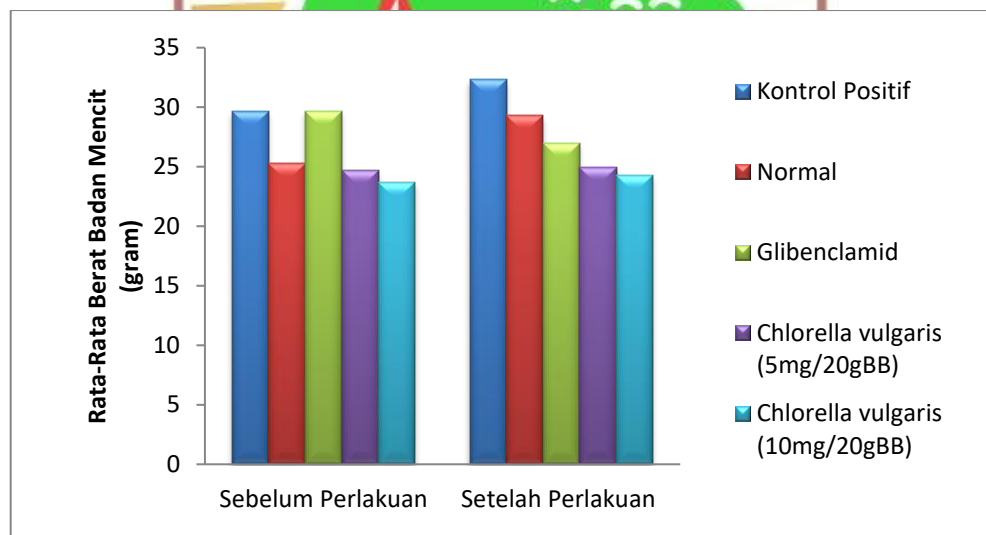


Gambar 4.3 Biomassa kering mikroalga *Chlorella vulgaris*

4.3 Penimbangan Berat Badan Mencit

Pada penelitian ini sebelum mencit diberi perlakuan, mencit diaklimatisasi selama 7 hari yang bertujuan agar mencit dapat beradaptasi dengan lingkungan yang berada disekitarnya, selama mencit diaklimatisasi akan diberi makan pakan BP-2. Setelah masa aklimatisasi mencit akan ditimbang berat badannya sebanyak 3 kali yaitu pada saat sebelum perlakuan, setelah 7 hari diinduksi aloksan, dan setelah perlakuan selama 28 hari. Penimbangan berat badan ini bertujuan untuk melihat efek yang ditimbulkan dari aloksan terhadap berat badan masing-masing mencit dan juga melihat efek dari mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap berat badan mencit diabetes.

Dibawah ini merupakan grafik perbandingan rata-rata berat badan mencit tiap kelompok sebelum perlakuan dan setelah perlakuan.



Gambar 4.4 Rata-Rata berat badan mencit masing-masing perlakuan

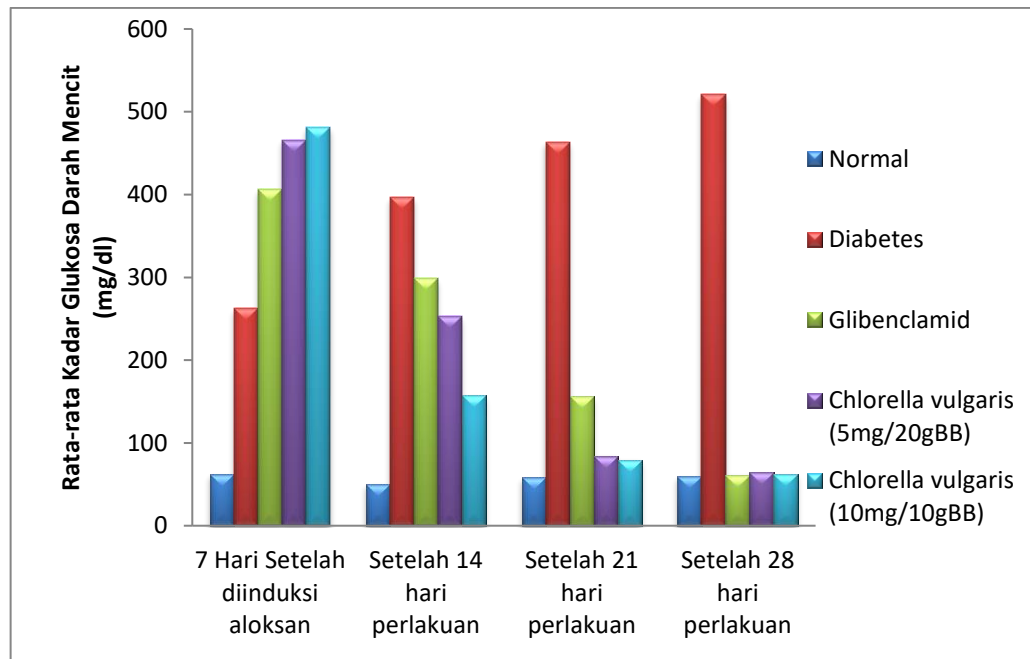
Gambar 4.4 merupakan grafik perbandingan rata-rata berat badan mencit sebelum perlakuan dan setelah perlakuan. Dapat dilihat bahwa perbedaan berat badan mencit baik sebelum perlakuan dengan setelah perlakuan tidak terlalu berbeda, pada kelompok diabetes terjadi peningkatan berat badan hal ini dikarenakan mencit terlalu banyak kehilangan kalori sehingga membuat mencit tersebut dalam kondisi lapar yang membuat berat badan kelompok diabetes naik. Setelah pemberian

mikroalga *Chlorella vulgaris* dosis 5mg/20g BB dan 10mg/20 g BB berat badan mencit tidak terlalu berubah dengan sebelum perlakuan. Hal ini menandakan bahwa aloksan tidak terlalu berpengaruh terhadap berat badan mencit, ini terjadi disebabkan karna metabolisme tubuh mencit yang berbeda-beda dan tergantung pada serapan dan imun tubuh mencit tersebut sehingga ada beberapa mencit yang mengalami kenaikan berat badan dan penurunan berat badan baik itu setelah diinduksi aloksan maupun setelah perlakuan selama 28 hari. Peningkatan berat badan diduga karena mencit mengalami kehilangan kalori yang cukup besar pada keadaan diabetik. Ini menyebabkan mencit mengalami gejala kelaparan dan meningkatkan asupan makanan. Perbedaan kenaikan berat badan terjadi karena mencit memiliki perbedaan secara genetis sehingga menimbulkan respon yang berbeda terhadap perlakuan yang diberikan⁴³.

4.4 Kadar Gula Darah Mencit

Pada penelitian ini dilakukan uji kadar gula darah (glukosa darah) dengan menggunakan alat glukometer. Pengujian gula darah dilakukan sebanyak 4 kali yaitu pada saat 7 hari setelah diinduksi aloksan, setelah 14 hari, 21 hari, dan 28 hari perlakuan dengan pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* dosis 5mg/20g BB dan 10mg/20g BB. Pengujian gula darah dilakukan setiap minggu hal ini untuk melihat efek pemberian baik dari aloksan maupun mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap kenaikan atau penurunan gula darah.

Dibawah ini merupakan grafik perbandingan rata-rata kadar glukosa darah tiap kelompok setelah diinduksi aloksan dan setelah perlakuan selama 28 hari pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris*.



Gambar 4.5 Rata-Rata kadar glukosa darah mencit masing-masing perlakuan

Gambar 4.5 merupakan perbandingan rata-rata kadar glukosa darah mencit 7 hari setelah diinduksi aloksan dengan yang diberi perlakuan selama 28 hari. Dapat dilihat pada grafik bahwa rata-rata kadar gula darah mencit yang setelah diinduksi aloksan selama 7 hari mengalami kenaikan yang sangat jauh dibandingkan dengan normal. Hal ini dikarenakan aloksan merupakan senyawa toksik yang langsung merusak sel β pankreas mencit sehingga membuat gula darah mencit naik lebih besar dibandingkan dengan gula darah mencit normal. Pada kontrol diabetes terjadi kenaikan rata-rata kadar glukosa darah mencit setiap minggunya dengan rata-rata paling tertinggi yaitu 494,3 mg/dl, berdasarkan rata-rata yang didapat dari kontrol positif hal ini menunjukkan bahwa mencit tersebut telah mengalami diabetes dan terjadinya kerusakan pada organ pankreas. Pada perlakuan dengan obat Glibenclamid dapat dilihat pada grafik bahwa pemberian obat glibenclamid pada mencit diabetes selama perlakuan 28 hari rata-rata glukosa darah mencit telah mencapai rata-rata glukosa darah mencit normal yaitu sebesar 61,3 mg/dl. Pada pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* dosis

5mg/20g BB selama 28 hari pada grafik menunjukkan penurunan gula darah paling banyak terjadi pada hari ke 21 dimana rata-rata glukosa darah mencit telah mendekati normal yaitu sebesar 84,3 mg/dl. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis 5 mg/20g BB telah mampu menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes, begitu juga pada dosis 10 mg/20g BB rata-rata penurunan glukosa darah pada hari ke 21 yaitu sebesar 79.3 mg/dl hal ini membuktikan bahwa mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan dosis 10 mg/20g BB lebih cepat menurunkan kadar glukosa darah mencit diabetes.

Penelitian di lanjutkan sampai hari ke 28 bertujuan untuk melihat apakah mikroalga *Chlorella vulgaris* ini memiliki efek yang dapat membuat penderita diabetes menjadi hipoglikemia. Rata-rata mikroalga dosis 5mg/20g BB dan 10mg/20g BB saat perlakuan pada mencit hari ke 28 dapat dilihat bahwa rata-rata kadar glukosa darah mencit yaitu 65mg/dl dan 62,7 mg/dl. Pada dosis 5mg/20g BB dan 10mg/20g BB tidak menunjukkan adanya penurunan kadar glukosa darah yang dibawah rata-rata dan sesuai dengan literatur bahwa kadar glukosa darah mencit yaitu sekitar 50-100 mg/dl⁴⁴. Dosis yang paling efektif untuk menurunkan kadar glukosa darah mencit yaitu mikroalga dosis 10mg/20g BB dengan persentase penurunan kadar glukosa darah sebesar 86,9%, dosis ini efektif untuk menurunkan kadar glukosa darah. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis tinggi mengandung senyawa aktif yang lebih banyak, sehingga dapat menurunkan kadar glukosa darah lebih besar.

Dampak pemberian aloksan terhadap kenaikan glukosa dalam darah diakibatkan karna aloksan bereaksi dengan merusak substansi esensial di dalam sel beta pankreas sehingga menyebabkan berkurangnya granula-granula pembawa insulin di dalam sel beta pankreas. Aloksan meningkatkan pelepasan insulin dan protein dari sel beta pankreas. Efek ini spesifik untuk sel beta pankreas sehingga aloksan dengan konsentrasi yang tinggi tidak berpengaruh terhadap jaringan lain. Mekanisme kerja aloksan secara invitro menunjukkan bahwa aloksan menginduksi pengeluaran ion kalsium dari mitokondria yang mengakibatkan proses

oksidasi sel terganggu. Keluarnya ion kalsium dari mitokondria mengakibatkan homeostatis yang merupakan awal dari matinya sel⁴⁵.

Mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki salah satu senyawa aktifnya adalah flavonoid yang memiliki peranan dalam menurunkan kadar glukosa darah. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas hipoglikemik atau penurunan kadar gula darah⁴⁶. Senyawa flavonoid ini dapat menurunkan kadar gula darah dengan cara merangsang sel β pankreas untuk memproduksi insulin lebih banyak⁴⁷.

4.5 Aktivitas Enzim Katalase dan Malondialdehid (MDA) dalam Serum Darah Mencit Diabetes

Pada penelitian ini dilakukan pemeriksaan enzim Katalase (CAT) dan Malondialdehid (MDA) yang bertujuan untuk melihat stress oksidatif pada mencit diabetes. Malondialdehid (MDA) merupakan salah satu senyawa produk dari reaksi peroksidasi lipid yang digunakan sebagai marker (petanda) terjadinya stress oksidatif. Pada keadaan stress oksidatif yang tinggi, terjadi peningkatan kadar MDA serum secara signifikan. Bila keadaan stress oksidatif teratasi, kadar MDA kembali menurun²⁰.

Kerusakan sel atau jaringan akibat stress oksidatif ini dapat diperlambat dengan pemberian antioksidan, dimana antioksidan merupakan salah satu senyawa flavonoid. Katalase (CAT) merupakan salah satu enzim pertahanan antioksidan, tubuh memiliki pembentukan antioksidan sendiri untuk menyeimbangi radikal bebas yang terbentuk, jika enzim pertahanan tidak mampu untuk melawan radikal bebas maka akan menimbulkan stress oksidatif dimana akan menyebabkan naiknya kadar peroksidasi lipid atau malondialdehid (MDA). Hasil uji enzim katalase (CAT) dan malondialdehid (MDA) dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.4 Hasil uji aktivitas enzim katalase (CAT) dan malondialdehid (MDA).

NO	SAMPEL	MDA (nmol/ml)	Katalase (Unit/mg)
1	Normal	2,16	9,08
2	Diabetes	3,87	7,83
3	Obat Glibenclamid	2,76	9,42
4	<i>Chlorella vulgaris</i> 5 mg/20g BB Perlakuan 14 hari	3,43	8,33
5	<i>Chlorella vulgaris</i> 10 mg/20g BB Perlakuan 14 hari	3,43	8,23
6	<i>Chlorella vulgaris</i> 5 mg/20g BB Perlakuan 28 hari	1,34	8,32
7	<i>Chlorella vulgaris</i> 10 mg/20g BB Perlakuan 28 hari	1,94	8,03

Berdasarkan pada Tabel 4.4 dapat dilihat bahwa terjadinya peningkatan kadar malondialdehid (MDA) pada kelompok diabetes yaitu sebesar 3,87 nmol/ml. Setelah pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* selama 28 hari dapat dilihat bahwa kadar malondialdehid pada kelompok *Chlorella vulgaris* dosis 5mg/20g BB dan 10mg/20g BB yaitu 1,34 nmol/ml dan 1,94nmol/ml. Jika dibandingkan dengan kelompok normal kadar malondialdehid terhadap 2 dosis ini telah mendekati kadar malondialdehid pada kelompok normal yaitu sebesar 2,16 nmol/ml. Pada uji aktivitas enzim katalase terjadi penurunan kadar enzim pada kelompok diabetes yaitu sebesar 7,83 unit/mg. Pada kelompok perlakuan setelah pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* selama 28 hari didapat kadar enzim katalase *Chlorella vulgaris* dosis 5 mg/20g BB dan 10 mg/20g BB yaitu 8,32 unit/mg dan 8,03 unit/mg, hal ini menunjukkan bahwa terjadinya peningkatan kadar enzim katalase setelah pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris* selama 28 hari.

Pengaruh aloksan terhadap penurunan stress oksidatif diakibatkan oleh aksi sitotoksik aloksan yang dimediasi oleh radikal bebas. Aksi toksis aloksan pada sel beta diinisiasi oleh radikal bebas yang dibentuk oleh reaksi redoks. Aloksan dan produk reduksinya asam dialurik membentuk

siklus redoks dengan formasi radikal superoksida. Radikal ini mengalami dismilasi menjadi hydrogen peroksida. Radikal hidroksil dengan kereaktifan yang tinggi dibentuk oleh reaksi fenton. Aksi radikal bebas dengan rangsangan tinggi meningkatkan konsentrasi kalsium sitosol yang menyebabkan destruksi cepat pada sel beta⁴⁵.

Mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki kandungan senyawa flavonoid yang aktif sebagai antioksidan yang dapat menyeimbangi terbentuknya radikal bebas didalam tubuh, sehingga produksi radikal bebas didalam tubuh akan berkurang. Peningkatan radikal bebas didalam tubuh ditandai dengan meningkatnya kadar peroksidasi lipid (MDA) yang merupakan marker dari stress oksidatif. Jika terjadi peningkatan peroksidasi lipid didalam darah maka akan meningkat pula stress oksidatif didalam tubuh yang menyebabkan produksi radikal bebas akan semakin banyak. Pada penelitian ini mikroalga *Chlorella vulgaris* mampu untuk menurunkan kadar malondialdehid (MDA), jika enzim malondialdehid meningkat didalam darah menunjukkan enzim pertahanan antioksidan didalam tubuh menurun, hal ini menunjukkan banyaknya radikal bebas didalam tubuh yang membuat kadar enzim katalase akan menurun. Mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki senyawa flavonoid yang mampu menangkal radikal bebas didalam tubuh yang dapat dibuktikan pada Tabel 4.4 dimana terjadinya peningkatan kadar enzim katalase pada kelompok pemberian mikroalga *Chlorella vulgaris*.

